



## 平成21年度各分野における学会賞(学術賞)等の受賞者

雑誌名	東北医学雑誌
巻	121
号	2
ページ	189-198
発行年	2009-12
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/51448">http://hdl.handle.net/10097/51448</a>

—— 第8回日本 NO 学会優秀賞 ——

## 高糖状態によるメサングウム細胞の前暴露はアンジオテンシン II 刺激による酸化ストレスを増強させた

阿 部 倫 明

東北大学病院 腎高血圧内分泌科 (現: 仙台社会保険病院 腎センター)



### 要 旨

〔目的〕糖尿病性腎症において、糸球体メサングウムの組織障害には、酸化ストレスの増大が関与していると考えられている。これまで、高濃度のグルコースやアンジオテンシン II (Ang II) による刺激はメサングウム細胞の酸化ストレスを増強すると報告された。しかし、これらの刺激により促進される活性酸素産生系がどのような相互関係を有しているか、未だ不明である。今回、Ang II 刺激により産生される酸化ストレスが、前処置のグルコース濃度によりどのような影響を受けるか検討した。〔方法〕メサングウム細胞を様々な濃度のグルコース下で培養し、慢性または急性に Ang II で刺激した。細胞内の酸化ストレスは、Dihydroethidium と DCF-DA で蛍光標識し、リアルタイム顕微鏡法により観察した。〔結果〕5.5 mM グルコース下、 $10^{-7}$  M Ang II で慢性に刺激した場合、細胞内活性酸素は増強しなかった。しかしながら、13.5 mM グルコース下では細胞内活性酸素は有意に増強した。この反応は Apocynin や mitochondrial uncoupler, CoQ inhibitor により、著明に抑制された。次に、Ang II 刺激による細胞内酸化ストレスの急性反応を調べたところ、その増加反応は、前処置のブドウ糖の濃度に依存して増強した。この反応はアンジオテンシン 1 型受容体拮抗薬で阻害され、アンジオテンシン 2 型受容体拮抗薬で増強した。更に、グルコースや Ang II 刺激による Nox4・p47phox・p22phox・UCP 等の mRNA 変化を RT-PCR により検討した。〔考察〕アンジオテンシン 1 型受容体活性化によるメサングウム細胞の酸化ストレスは、予め細胞が高糖状態に曝されると、増強することが示唆された。また、この細胞の NAD(P)H オキシダーゼも Priming により活性化される可能性が示唆された。

### 緒 言

酸化ストレスとは、活性酸素種 ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $ONOO^{\cdot}$ ,  $H_2O_2$  等) の総称である。腎内酸化ストレスの亢進は、組織傷害・内皮機能障害・尿排泄障害を介して血圧上昇や腎機能障害に関係があることが分かってきた (図 1A)。私は腎臓内の酸化ストレス産生機序について研究を進めてきた。腎臓は、解剖学的に腎糸球体が存在する腎皮質と主に尿細管と集合管からなる腎髄質に大きく分かれる。腎灌流血液量全体のうち、腎皮質には 85%、腎髄質には 15% が灌流する。腎皮質灌流は全身血圧の変化に無関係に一定である (腎臓の Autoregulation) のに対し、腎髄質灌流は全身血圧に比例するという特徴がある。Guyton らによる腎機能関係 (= 圧利尿関係) によれば、食塩感受性高血圧症患者では、日常生活で摂取した食塩を尿中に速やかに排泄できないため、体液貯留が生じ高血圧が発生していると説明される。これまでの報告より、この腎髄質灌流量の低下は尿中 Na 排泄量を低下させ、結果的に血圧が上昇することが分かっている。以前の我々の研究から、腎髄質の Henle 太い上行脚 (mTAL) への食塩負荷は細胞内の活性酸素を増加させ NO を減弱させた<sup>1)</sup>。このような腎髄質における活性酸素と NO のバランス異常が食塩感受性高血圧の原因と考えられている<sup>2,3)</sup>。

糖尿病性腎症でも、腎内酸化ストレスがその病態生理に深く関与していることが数多く報告されている<sup>4,5)</sup>。腎内酸化ストレスの産生部位の中で、糸球体メサングウムは大変重要な役割を担っている。今回、メサングウム細胞における酸化ストレス応答性、およびその調節機序について検討したので報告する。

### はじめに

腎糸球体は、解剖学的に全身循環に対し窓のような存在である。糸球体の酸化ストレスは、糖尿病初期か

らメサングウム細胞の形態異常に密接に関与している。その糸球体における、主要な酸化ストレス産生部位はメサングウム細胞である。また多くの臨床研究より、糖尿病性腎症の治療には厳格な血糖コントロールとアンジオテンシンII (Ang II)の阻害が有効であることが明らかである。メサングウム細胞において、高グルコース状態やAng IIは、各々酸化ストレスを増加させることは報告されている<sup>6,7)</sup>。しかしながら、これらの2つの因子が細胞内シグナルにどのような相互作用をもって酸化ストレスを産生させているか未だ不明である。本研究では、メサングウム細胞において、酸化ストレス産生に関する高グルコース状態とAng IIの相互作用を研究した。

## 方 法

### リアルタイム蛍光顕微鏡法 (図1C)

クール CCD ビデオカメラ Ixon (Andor Co.) と Sutter DG-4/175-W Xenon-Arc lamp (Sutter Instruments) の光源を装着した倒立型蛍光顕微鏡 (IX71, Olympus) を用いて研究した。実験チャンバーは、TC-344B と TA-29 (Warner Instruments) に温

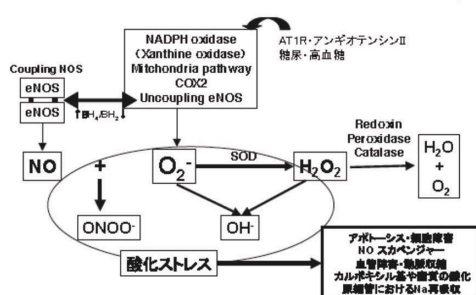
度制御し 37°C の定常状態を保った。また、図のように持続灌流装置を装着した。蛍光標識は MetaFluor imaging software (Universal Imaging Co.) によって定量化した。

### プロトコール

プロトコール1: ヒトメサングウム細胞をカバーガラス上に 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>/37°C 条件下で 80-90% コンフルエントに培養した。5.5 mM, または 13.5 mM グルコース, および Ang II (10<sup>-7</sup> M) の存在・非存在下で 6 時間培養し, その後 Dihydroethidium (DHE) で活性酸素を測定した。活性酸素が変換・生成した ethidium は, excitation 480 nm/emission 605 nm より観察された。抑制実験として, メサングウム細胞を apocynin (NADP オキシダーゼ活性化抑制剤), tiron (活性酸素阻害薬), RNH6270 (Ang II-1 型受容体阻害薬), L-glucose により前処置を行った。

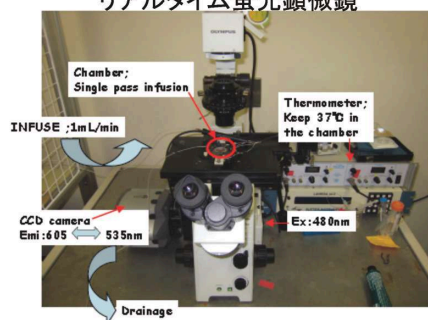
プロトコール2: ヒトメサングウム細胞をカバーガラス上に 80-90% コンフルエントに培養し, 5.5 mM, 13.5 mM または 27.8 mM グルコースで 6 時間培養した。持続灌流装置を装着した実験チャンバーを使用し, Ang II による酸化ストレスの急性産生作用を 5',6'-

#### 1A. 活性酸素種 (Reactive Oxygen Species ; ROS)

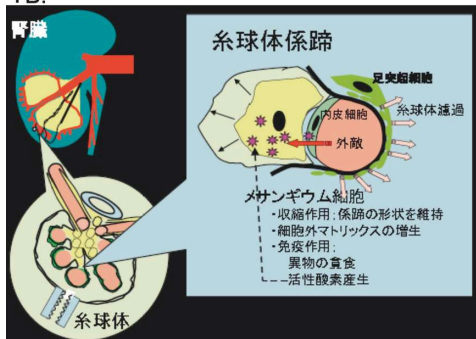


#### 1C.

### リアルタイム蛍光顕微鏡



#### 1B.



#### 1D. 仮説: アンジオテンシンIIによる NOXのPriming event

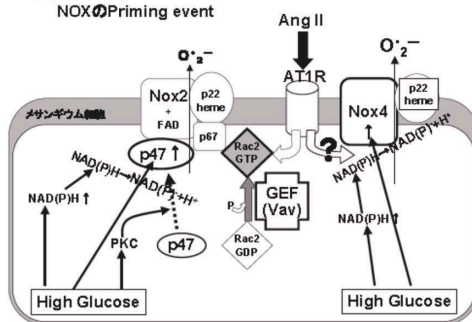


図1.

chloromethyl-2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) で調べた。DCF の蛍光シグナルは Excitation 480 nm/Emission 535 nm より観察された。抑制実験には、PEG-catalase, PD12319 (AngII-2 型受容体阻害薬), RNH-6270 を使用した。

### RNA の単離と Real-Time PCR

高グルコース, または Ang II の条件下で 6 時間培養後のヒトメサングウム培養細胞から RNeasy kit (Qiagen) を使用し抽出された RNA は, QuantiTECTR Kit (Qiagen) により cDNA に変換された。その cDNA (30 ng) を template に TaqManR Gene Expression Assays (Applied Biosystems) により Real-Time PCR を行った。

### Western プロット

条件培養後のメサングウム細胞からタンパク質を抽出し, 抗ヒト Rac1 抗体(1:200, Santa Cruz)・抗ヒト Vav2 抗体(1:200, Abcam) を使用し, Rac1・Vav2 の蛋白発現を調べた。

### 統計学的分析

活性酸素の産生速度を比較するため, 300 秒間の Eth 反応勾配を計算した。データは平均±SE により表記した。また, 検定は student *t*-test で行い *p* 値を求めた。

## 結 果

### プロトコール 1

高グルコースと Ang II で培養後では, 活性酸素産生は Ang II 非存在のコントロールに比べ, 有意に増加していた (図 2A, 2B)。この反応は RNH6270 で抑制された。しかしながら, 正常グルコース濃度下では Ang II の存在に関わらず, 活性酸素の産生は増加しなかった (図 2B)。L-Glucose の実験より, この反応は浸透圧変化による影響ではなかった。更に, この反応は Tiron, Apocynin で抑制された (図 2C)。したがって, この反応には NADPH オキシダーゼ (NOX) の関与が考えられた。

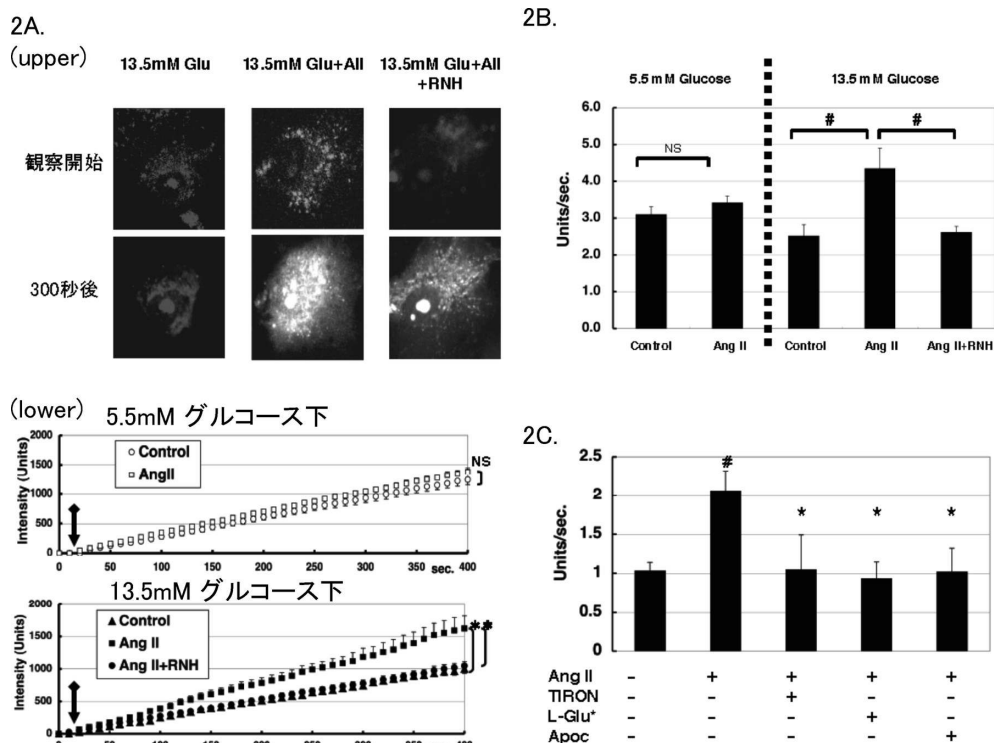


図 2.

## プロトコール2

次に Ang II 刺激による急性の酸化ストレス産生反応を調べた。実験チャンバーに Ang II を投与すると、酸化ストレス産生が亢進した。この反応は、前処置のグルコース濃度が高い時、より強く認められた (図 3A)。また、細胞内に PEG-Catalase を取り込ませると、この反応は抑制された (図 3A)。更に、この反応は、PD123319 前処置で増強され、RNH-6270 で減弱された (図 3B)。したがって、アンジオテンシン受容体が反応の引き金になっていることが考えられた。

## 細胞内シグナル伝達系の調査

高グルコースで前処置後に、Ang II 刺激による酸化ストレス産生がより亢進する機序を調べた。高グルコース、または高グルコース+Ang II 条件下で培養した後に、mRNA を抽出し NOX・NOX の sub-component の発現を調べた。高グルコース培養後に、NOX4 と p47phox の mRNA が上昇していた。しかし、NOX2 の mRNA 発現は高グルコースにより減少した (図 3C)。

また、NOX の活性化機序を調べるために、guanine

nucleotide exchanger factor (GEF) の一つ Vav2 とその下流の Rac のタンパク量を調べたところ、高グルコース培養により両者とも発現増加が認められた (図 3D)。

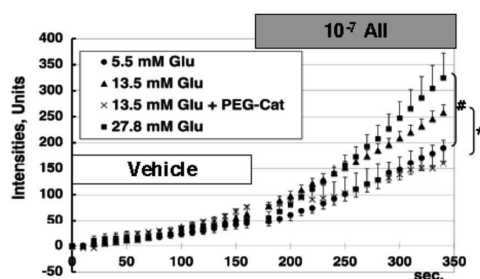
## 考 察

本研究では、高グルコース濃度でメサングウム細胞を予め前培養することによって、AT1R 刺激後の細胞内活性酸素がより増強することを示した。そして、高グルコース暴露によってどのような細胞内機序が作用し、Ang II 刺激による酸化ストレス産生が増強されるか研究した。

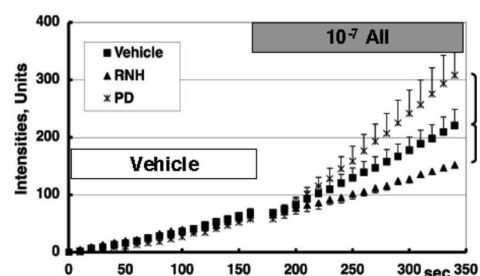
高グルコースは、ミトコンドリア電子伝達系の過剰活動を引き起こし、細胞内の酸化ストレスを亢進させる<sup>8)</sup>。また、高グルコースが、NOX 活性を上昇させ、活性酸素を増悪させるという報告もある<sup>9)</sup>。今回の我々の研究結果により、高グルコース状態が、AT1R 刺激後の細胞内シグナルを増加させ、NOX による活性酸素産生を増強する可能性が分かった。

これまで、白血球や網内径細胞において、EGF などの成長因子が small G タンパク質の Rac を活性化し、

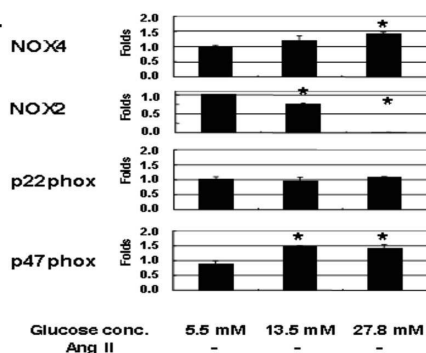
3A.



3B.



3C.



3D.

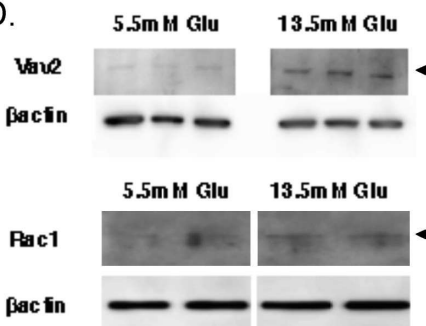


図 3.

NOX 複合体を形成し活性酸素を産生するという機序が知られている (Priming Activation)<sup>10)</sup>。我々の研究でも, Ang II 刺激後 1-2 分で活性酸素の増加が認められ, NOX の Priming activation が起きている可能性が考えられた。高グルコースの暴露は, メサンギウム細胞内の Vav2 と Rac1 を活性化させることによって, Ang II による NOX の活性化をより強く発揮させられる可能性が考えられた。

糖尿病性腎症の治療には, 血糖コントロールとレニン-アンジオテンシン系抑制による厳格な血圧コントロールが重要であるが, これまで高血糖状態とアンジオテンシン II のどちらがより強い糖尿病性腎症の悪化因子であるか不明であった。本研究により, それぞれ別々の経路を刺激し, その後共通の細胞内シグナルを増強し, 相乗効果的な酸化ストレス応答反応が発生することが考えられた。

## 結 語

1. メサンギウム細胞では, グルコース暴露によって Ang II 刺激による酸化ストレス産生が増強した。

2. 高濃度のグルコースは, メサンギウム細胞内の Vav 蛋白の発現増強により, AT1R による強い Nox の作用が priming activation を引き起こした。

3. 高血糖は, Ang II によるメサンギウム細胞の Nox2 の priming をより増強すると考えられたが, 高血糖 Nox4 がより強く活性酸素の産生に寄与したと考えられた。

## 謝 辞

第 8 回日本 NO 学会優秀賞を受賞するにあたり, 御指導を頂きました当科の伊藤貞嘉教授, また学会会長の循環器内科の下川宏明教授には, 厚く御礼を申し上げます。

## 文 献

1) Abe, M., Kaldunski, M., Liang, M., et al. (2006)

Effect of Sodium Delivery on Superoxide and Nitric Oxide in the Medullary Thick Ascending Limb. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **291**, F350-357.

2) Mori, T., O'Connor, P.M., Abe, M., et al. (2007) Enhanced superoxide production in renal outer medulla of Dahl salt-sensitive rats reduces nitric oxide tubular-vascular cross-talk. *Hypertension*, **49**, 1336-1341.

3) Cowley, A.W. Jr. (2008) Hypertension. *Renal medullary oxidative stress, pressure-natriuresis, and hypertension*, **52**, 777-786.

4) Lee, H.B., Yu, M.R., Yang, Y., et al. (2003) Reactive Oxygen Species-Regulated Signaling Pathways in Diabetic Nephropathy. *JASN*, **14**, S241-S245.

5) Kanauchi, M., Nishioka, H. and Hashimoto, T. (2002) Oxidative DNA Damage and Tubulointerstitial Injury in Diabetic Nephropathy. *Nephron*, **91**, 327-329.

6) Jaimes, E.A., Galceran, J.M. and Raij, L. (1998) Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. *Kidney Int.*, **54**, 775-784.

7) Xia, L., Wang, H., Goldberg, H.J., et al. (2006) Mesangial cell NADPH oxidase upregulation in high glucose is protein kinase C dependent and required for collagen IV expression. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **290**, F345-F356.

8) Nihikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., et al. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycemic damage. *Nature*, **404**, 787-790.

9) Satoh, M., Fujimoto, S., Haruna, Y., et al. (2005) NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **288**, F1144-F1152.

10) Sheppard, F.R., Kelher, M.R., Moore, E.E., et al. (2005) Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J. Leukoc. Biol.*, **78**, 1025.

—— 第 43 回日本理学療法学会大会 日本理学療法学会大会会長賞 ——

## Contraversive pushing を呈した脳卒中症例の責任病巣と経過

阿部 浩明<sup>1,2)</sup>, 近藤 健男<sup>2)</sup>, 藤原 悟<sup>3)</sup>, 出江 紳一<sup>2,4)</sup>

<sup>1)</sup>財団法人広南会 広南病院・東北療護センター リハビリテーション科,

<sup>2)</sup>東北大学大学院医学系研究科 肢体不自由学分野, <sup>3)</sup>財団法人広南会 広南病院 脳神経外科

<sup>4)</sup>東北大学大学院 医工学研究科



### はじめに

脳卒中急性期に比較的多くの割合で contraversive pushing (以下 push-

ing) が出現し、多くの場合消失することが報告されている (Pedersen, Karnath). Pushing の責任病巣には一定の見解が得られておらず、消失のメカニズムに関しても不明である。Pushing は動作を阻害し ADL を低下させるため、早期に消失させることが望まれる。Pushing に対する有効な治療を検討するには出現と改善のメカニズム解明が必要である。本研究の目的は責任病巣および経過から pushing 出現と改善のメカニズムを検討し有効な治療法を検討する一助とすることである。

### 対象と方法

平成 18 年 5 月 25 日から平成 19 年 5 月 31 日までの間に理学療法処方であった脳卒中患者 547 名を対象とした。Pushing の有無は Scale for contraversive pushing (以下 SCP) を用い、SCP の各項目いずれも >0 を満たす場合に pushing 有り と判定した。初回評価から入院中の SCP 経過をカルテから、責任病巣を MRI・CT 画像から後方視的に調査した。

### 結 果

Pushing が出現した症例は 41 例で出現率は 7.5%, 年齢は  $73.2 \pm 9.9$  歳, 性別は男性 23 名, 女性 18 名, 診断名は脳梗塞 20 名, 脳出血 21 名, 損傷半球は右 23 名, 左 18 名であった。経過は多くの例で比較的早期(数週間)に改善する傾向がみられたが改善しない例も存在

した。改善しない例には意識障害もしくは FIM 理解と社会的交流項目の低下が共通してみられた。責任病巣は様々であったが診断名及び病巣から 5 型 (1 型: 視床病変, 2 型: MCA 領域梗塞, 3 型: 島まで及ぶ被殻出血, 4 型: 広範皮質下出血, 5 型: 脳室拡大・脳萎縮を伴う内包後脚・放線冠病変) に分類できた。病巣のタイプごとの経過の特徴としては 1, 3, 4 型は意識障害合併例が存在し、また、2 型では FIM 理解・社会的交流低下の症例が存在し改善する例としない例が混在した。5 型は意識障害や FIM 理解・社会的交流低下を伴う症例がなく全例早期に回復した。退院などの理由により追跡が困難であった例と意識障害例, FIM 理解・社会的交流低下例を除外すると、全型でほぼ全例において比較的早期に改善がみられたが、2 型では長期にわたり改善のない症例が 2 例 (いずれも右半球損傷) みられた。

### 考 察

責任病巣 1 から 4 型は Karnath, Johannsen et al. の報告とほぼ一致する。すなわち 1 から 4 型は second graviceptive system (以下 SGS) の障害と推察される。一方、5 型は入力系の miss match とは異なり、出力系のプロセスでの障害でも pushing が出現することを示唆する。このことから非麻痺側での過剰な抗重力反応の脱抑制作用が関与する事、あるいは、垂直定位メカニズムを構築する入力系・出力系を包含した一連のネットワークを形成するいずれかの部位の損傷においても遠隔的に機能低下が起こる事が推察された。しかしながら、pushing を呈する症例は非麻痺側への異常な転倒恐怖、正中位保持時の身体軸非麻痺側傾斜感を訴えることから単に非麻痺側での抗重力反応の脱抑制のみとは考えにくい。現時点ではネットワークの一部に障害がある場合の遠隔的機能低下が有力と考えられる。

追跡期間中に多くの症例で pushing の消失や軽減

がみられ過去の報告と矛盾しなかったが、軽減しない症例もみられた。軽減しない症例の特性として意識障害と FIM 理解・社会的交流低下が挙げられた。この結果より学習が何らかの要因で阻害されなければ pushing は改善することが示唆される。

なぜ著しい垂直定位障害が消失するかについて一つの可能性としては代償が考えらる。Karnath et al. は一連の研究により姿勢保持に最も重要な入力系の機構である前庭覚、体性感覚、視覚は pushing の出現に直接的な関与がないと報告している。SGS の障害は視覚、体性感覚、前庭覚により代償されるため著しい体軸のずれは時間経過とともに修正され再構築されていくと考える。また、5 型のようにネットワーク障害を示唆する所見もあり新たなネットワークの構築が脳内で行われている可能性もある。もしくは新たな領域に representation が起る可能性もある。2 型では 2 症例で長期に回復が得られなかった。その 2 症例は皮質に広範な損傷が及び Johannsen et al. が視床以外に pushing が出現する症例の責任病巣として推察した posterior insula, postcentral gyrus の損傷を包含していた。

Second graviceptive cortex (以下 SGC) が存在するとすれば、2 型の 2 症例で回復遅延したのは、SGC そのものの皮質損傷がある場合に、他のネットワーク障害と比較すると長期に回復時間を要することを示唆するとも考えられる。一方、右半球損傷に伴う unilateral spatial neglect (USN) や motor impersistence (MI) などの皮質症状は古くから pushing を伴う症例に合併することが知られ、皮質症状のない症例では回復が早い (Dannels, 萩田, 網本) という報告もあり皮質症状が直接回復を遅れらせる要因となりえる。今回の結果からは早期に回復した例においても USN 合併例は存在しており 2 症例にのみ合併したのは MI であったため、MI の関与が回復を遅延させた要因とも推察できる。

これらのメカニズムを詳細に検討するにはさらなる研究を必要とする。その回復メカニズムが明らかとなればこれまで提唱されている介入方法 (Karnath, Broets, Paci, 網本) が真に効果的な方法であるかを検討でき、更には新たな介入方法の開発につながる可能性もあると思われる。



## Maf 転写因子による新規 DNA 配列認識の構造基盤

黒 河 博 文

東北大学大学院医学系研究科 医化学分野



### はじめに

Maf 群因子は西澤らにより 1989 年、ニワトリに腫瘍を引き起こすレトロウイルス AS42 から発見された v-Maf に相同性の高い一群の転写因子であり<sup>1)</sup>、塩基性-ロイシンジッパー (bZip) 構造を有する<sup>2)</sup>。Maf 群因子は、大 Maf 群因子と小 Maf 群因子の 2 つのグループに分類される。大 Maf 群因子はアミノ末端領域に転写活性化領域を持ち、ホモ二量体として機能する。一方小 Maf 転写因子は転写活性化領域を有しておらず、当初は、小 Maf 群因子は大 Maf 群因子と競合的に結合する抑制因子であると予想された。しかし、1994 年に五十嵐らが小 Maf 群因子が別の bZip 型転写因子である NF-E2 p45 (CNC 群因子) とヘテロ二量体を形成し機能することを明らかにした<sup>3)</sup>。さらに、小 Maf 群因子とヘテロ二量体を形成し機能する CNC 群因子として Nrf1, Nrf2, Nrf3, Bach 群因子として Bach1, Bach2 が同定され<sup>4)</sup>、これらの複数の bZip 型転写因子と小 Maf 群因子による転写制御システムが存在することが明らかとなった。

Maf 群因子がホモ二量体を形成して DNA に結合する際、その認識配列は TGCTGA (G or C) TCAGCA または TGCTGA (GC or CG) TCAGCA という 13 塩基あるいは 14 塩基の回文配列 (Maf 群因子認識配列, Maf recognition element; MARE) である<sup>5,6)</sup>。この配列は、c-Jun/c-Fos のヘテロ二量体からなる AP-1 の結合配列 TPA-responsive element (TRE) あるいは CREB/ATF の結合配列である cAMP-responsive element (CRE) を中心に包含しつつ、その外側に TGC...GCA という 3 塩基ずつの配列 (flanking 配列) をもつ。Maf 群因子が高い親和性で DNA に結合するためには、この flanking 配列が必須であることが大きな特徴である<sup>7)</sup>。しかし、Maf 群因子がこの flanking 配列をどのように認識しているかは不明のままであった。

本研究では Maf 群因子による MARE 認識の分子機構を解明するために、小 Maf 群因子 MafG-DNA 複合体の X 線結晶構造解析を行った。

### 方 法

MafG タンパク質サンプルは大腸菌を用いて大量発現し、その後アフィニティーカラム、イオン交換カラム等により高純度に精製した。DNA (MARE の 1 種 MARE25, 図 1A) との複合体について、蒸気拡散法による結晶化条件のスクリーニングを行った。その結果、複数の条件で結晶を得ることができた。結晶化条件の最適化を行い、得られた良質の単結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリーにおいて 2.8 Å 分解能の X 線回折データを取得することに成功した。位相決定はセレンメチオニン標識 MafG を用いて、MAD 法によって行った。

### 結果と考察

得られた MafG ホモ二量体-DNA 複合体の全体構造図をリボン図で示す (図 1A, B)<sup>8)</sup>。MafG ホモ二量体は DNA 主溝を「箸」で挟むような形で DNA と結合していた。MafG は 3 つのヘリックス (H1, H2, H3) から成り、Extended Homology Region (EHR) と呼ばれる MafG に特異的な領域は H1, H2 および H3 のアミノ末端部分から成っていた。H3 は DNA 結合に関わる塩基性領域、二量体形成に関わるロイシンジッパー領域からなる。EHR は Maf 群因子において高度に保存された領域であるため、flanking 配列の認識に関わっていると予想された。しかし、予想に反し、EHR 領域は DNA と直接相互作用をしていなかった (図 1B)。

Maf による flanking 配列認識機構を明らかにするため、DNA 結合に関わる塩基性領域を詳細に解析したところ、Arg57 と Asn61 が flanking 配列の塩基と直接相互作用していることが明らかとなった (図 1C, D)。また、AP-1 タイプの DNA 配列を認識する bZip

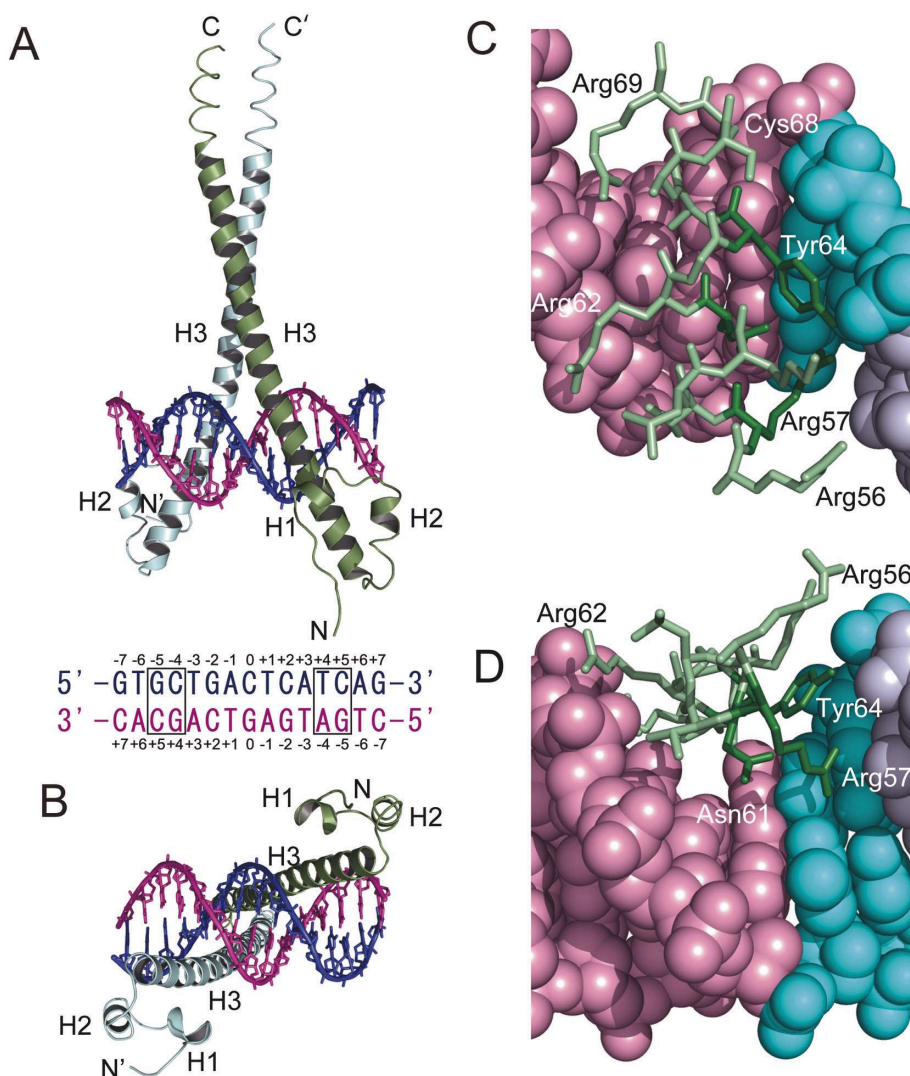


図1. MafG ホモ二量体-DNA 複合体の結晶構造. (A, B) MafG-MARE DNA 複合体のリボン図表示, MafG は H1, H2, H3 の3つのヘリックスからなる. H1, H2 ヘリックスと H3 ヘリックスのアミノ末端部が Maf 群因子に特異的な EHR を形成している. H3 ヘリックスはさらに, DNA 結合に関わる塩基性領域, 二量体化に関わるロイシンジッパー領域を形成している. 共結晶化に用いた MARE25 配列を示す (A). B は A を 90 度回転させた図. EHR 領域は DNA と直接相互作用していない. (C, D) 塩基性領域と DNA との相互作用. TRE 領域をピンク, Maf 群因子が特異的に認識する flanking 配列を水色で示す. Arg57, Asn61 が flanking 配列の認識に重要であることが明らかとなった. D は C を 90 度回転させた図.

型因子 (Fos-Jun, GCN4, Skn1) の結晶構造と MafG の結晶構造とを比較したところ, flanking 配列を認識する Arg57 と Asn61 の側鎖の向きが異なっていることが明らかとなった. つまり, Maf 群因子のユニークな DNA 配列認識は, Maf 群因子に特異的な構造モチーフではなく, bZip 型因子間でよく保存されたアミノ酸残基 (Arg57, Asn61) の側鎖の向きを変えて flank-

ing 配列を認識している, という驚くべき分子機構が明らかとなった.

## 文 献

- 1) Nishizawa, M., Kataoka, K., Goto, N., et al. (1989) v-maf, a viral oncogene that encodes a

- “leucine zipper” motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 7711-7715.
- 2) Motohashi, H., O'Connor, T., Katsuoka, F., et al. (2002) Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene*, **294**, 1-12.
  - 3) Igarashi, K., Kataoka, K., Itoh, K., et al. (1994) Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NF-E2 p45 with small Maf proteins. *Nature*, **367**, 568-572.
  - 4) Igarashi, K. and Sun, J. (2006) The heme-Bach1 pathway in the regulation of oxidative stress response and erythroid differentiation. *Antioxid. Red. Signal.*, **8**, 107-118.
  - 5) Kataoka, K., Noda, M. and Nishizawa, M. (1994) Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 700-712.
  - 6) Kerppola, T.K. and Curran, T. (1994) A conserved region adjacent to the basic domain is required for recognition of an extended DNA binding site by Maf/Nrl family proteins. *Oncogene*, **9**, 3149-3158.
  - 7) Motohashi, H. and Yamamoto, M. (2004) Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol. Med.*, **10**, 549-557.
  - 8) Kurokawa, H., Motohashi, H., Sueno, S., et al. (2009) Structural basis of alternative DNA recognition by Maf transcription factors. *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 6232-6244.